



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 31 346 A 1

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395
A 61 K 51/10

AD

⑳ Aktenzeichen: 195 31 346.1
㉔ Anmeldetag: 25. 8. 95
㉕ Offenlegungstag: 27. 2. 97

DE 195 31 346 A 1

㉚ Anmelder:
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit GmbH, 85764 Oberschleißheim, DE

㉛ Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

㉜ Erfinder:
Lindhofer, Horst, Dr., 80999 München, DE;
Thierfelder, Stefan, Prof. Dr., 82223 Eichenau, DE

㉞ Arzneimittel zur Immuntherapie, enthaltend Antikörper, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen

㉟ Es werden Arzneimittel beschrieben, die Antikörper mit mindestens einer Spezifität enthalten, die das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen. Ferner werden Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten beschrieben, die das MHCII-Antigen eines Patienten erkennen, sowie diese enthaltende diagnostische Zusammensetzungen.

DE 195 31 346 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 97 602 069/362

17/26

Die vorliegende Erfindung betrifft Arzneimittel zur Immuntherapie, enthaltend Antikörper, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen, Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, die mindestens eine Antigenbindungsstelle aufweisen, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennt, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Immuntherapie. Die beschriebenen Arzneimittel und Antikörper sind insbesondere geeignet für die Immuntherapie nach MHCII-inkompatiblen Knochenmarktransplantation (KMT).

Die Knochenmarktransplantation bietet sich als eine aussichtsreiche Therapie an für Leukämiepatienten, bei denen es trotz Chemotherapie zum Leukämierückfall kommt. Mit Hilfe von Knochenmarktransplantationen ist es möglich, Langzeitremissionen und Heilung herbeizuführen, so daß Patienten bereits 20 Jahre und länger leben und als geheilt angesehen werden können. Nach wie vor sterben jedoch nach Knochenmarktransplantationen viele behandelte Patienten am Leukämie rezidiv, der Metastasierung der ursprünglichen Leukämie. Dies beruht offensichtlich darauf, daß Ganzkörperbestrahlung und hochdosierte Chemotherapie, die dem Ersatz der verlorengegangenen Blutbildung des Patienten durch Transplantation von gesundem Knochenmark vorausgehen, häufig nicht ausreichen, um auch die letzten malignen Leukämiezellen dauerhaft zu eliminieren.

Innerhalb der letzten 14 Jahre wurden keine wesentlichen Fortschritte bei der Reduktion des Anteils der Patienten mit Leukämierückfällen nach Knochenmarktransplantation erreicht. Die bisherigen Therapiemöglichkeiten scheinen in dieser Beziehung ausgeschöpft. Neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten zur Eliminierung residualer, trotz Chemotherapie und Bestrahlung überdauernder Leukämiezellen erwägen insbesondere eine tumorimmunologische Zelltherapie, bei der Antikörper verwendet werden sollten, die Zellmarker erkennen, die spezifisch auf Leukämiezellen vorhanden sind. Ein wesentliches, bisher nicht gelöstes Problem besteht dabei jedoch darin, daß keine tumorspezifischen Markerantigene identifiziert werden konnten, aufgrund derer sich Leukämiezellen von nicht-malignen Blutzellen unterscheiden lassen (Kranz et al., Blood 73 (1989), 1942). Lediglich B-Zelltumore bilden individualspezifische, idiotypische Immunglobuline, die (auf den Einzelpatienten bezogen) als tumorspezifische Antigene angesehen werden können. Wie Untersuchungen mit chemisch konjugierten bispezifischen Antikörpern zeigten, neigen diese zellständigen Immunglobuline jedoch zu Modulation und Mutation, wodurch sie sich der Erkennung durch spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper entziehen (Stevenson et al., Blood 77 (1991), 1071). Die bisherigen Kenntnisse reichen daher nicht aus, um verbliebene Leukämiezellklone durch eine immunologische Zelltherapie auszuschalten.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Antikörper und diese enthaltende Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, die es erlauben, bestimmte Zielzellen, insbesondere Tumorzellen, von anderen Zellen aufgrund der Erkennung spezifischer Markerantigene zu unterscheiden, und die sich somit für eine immunologische Zelltherapie eignen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit Arzneimittel

enthaltend Antikörper mit mindestens einer Spezifität für das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten.

Derartige Arzneimittel eignen sich zur in vivo- und in vitro-Therapie verschiedener Tumorarten sowie zur Unterdrückung von Host-versus-Graft-Reaktionen, Autoimmunreaktionen und zur generellen Auslösung einer Immunsuppression. So können sie beispielsweise zur immunologischen Zelltherapie bei Tumorezidiven nach einer MHCII-inkompatiblen Knochenmarktransplantation, d. h. einer Transplantation, bei der sich das MHCII-Antigen des Spenders von dem des Empfängers unterscheidet, eingesetzt werden. Wie oben beschrieben wird die Knochenmarktransplantation häufig als letztes Mittel gegen chemotherapieresistente Leukämieformen eingesetzt. Bei diesen exprimieren vor allem B-Zell-Lymphome, aber auch andere Leukämieformen, die sich von Zellen ableiten, die aus der Hämatopoese hervorgehen, häufig das Histokompatibilitätsantigen MHCII. Dieses Oberflächenantigen ist hochpolymorph, wobei die unterschiedlichen Formen von spezifischen Antikörpern erkannt werden können. Da nach einer MHCII-inkompatiblen Knochenmarktransplantation alle in dem Patienten heranreifenden immunkompetenten (vom Spender stammenden) Zellen einen MHCII-Typ besitzen, der von dem des Tumors abweicht, kann der Tumor sehr selektiv durch Antikörper, die den MHCII-Typ des Empfängers erkennen, identifiziert und eliminiert werden. Zwar existieren neben den Zellen des Immunsystems andere Zelltypen, die MHCII-Antigen exprimieren, wie z. B. Leberzellen, jedoch ist die Expression und die Antigendichte auf der Zelloberfläche bei diesen Zelltypen im Vergleich zu malignen Zellen des Immunsystems derart gering, daß eine spezifische Erkennung der Tumorzellen, die MHCII-Antigen exprimieren, gewährleistet ist und andere Zellen oder Gewebe nicht nennenswert durch MHCII-spezifische Antikörper geschädigt werden.

Neben hämatopoetischen Zellen des Immunsystems exprimieren auch Zellen des Epithels (wie z. B. Langerhanssche-insulinbildende Inselzellen im Pankreas) und Zellen des Endothels in unterschiedlicher Ausprägung, insbesondere in entartetem Zustand, oder auch nach Stimulierung das MHCII-Antigen. Die vorgeschlagenen Arzneimittel bieten sich daher auch zur Immuntherapie von Tumoren an, die sich von derartigen Zellen ableiten.

Neben der Anwendung zur Tumorimmuntherapie eignen sich die erfindungsgemäßen Arzneimittel beispielsweise auch zur Immuntherapie, um eine Host-versus-Graft-Reaktion abzuschwächen oder zu unterdrücken. Nach allogener Knochenmarktransplantation können restliche, die Konditionierung (z. B. Bestrahlung, Chemotherapie) des Patienten überlebende, MHCII-positive Zellen des Empfängers zur Abstoßung des Transplantats in Form einer Host-versus-Graft-Reaktion führen. Durch anti-MHCII (vom Empfängertyp)-Antikörper können derartige immunkompetente Zellen des Empfängers, die das "Engraftment" (d. h. Anwachsen, Angehen) des neuen Knochenmarks oder anderer Spenderorgane verhindern, gezielt attackiert werden. Durch Verwendung von Antikörpern, die neben dem MHCII-Antigen des Empfängers ein Antigen erkennen, das auf einer immunkompetenten MHCII-positiven Zelle exprimiert wird, können für die Abstoßung des Transplantats verantwortliche Zellen noch selektiver ausgeschaltet werden.

Arzneimittel, die Antikörper enthalten, die spezifisch aktivierte T-Zellen erkennen, eignen sich beispielsweise

für die Behandlung von Autoimmunreaktionen oder generell für eine gezielte Immunsuppression.

Bei den Antikörpern, die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthalten sind, kann es sich um Antikörper mit lediglich einer oder mehreren Spezifitäten handeln. Der Ausdruck Spezifität bedeutet dabei die Fähigkeit eines Antikörpers, ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Das Antigen kann dabei von einer oder mehreren Antigenbindungsstellen des Antikörpers erkannt werden, die wiederum gleiche oder unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen können.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten die Arzneimittel Antikörper mit lediglich einer Spezifität, die das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen, d. h. sogenannte monospezifische Antikörper. Durch die Verwendung von derartigen Antikörpern kann eine Eliminierung von MHCII-präsentierenden Zellen beispielsweise durch Komplement-Reaktionen oder antikörpervermittelter Zytotoxizität mittels Fc-Rezeptor-tragender Zellen bewirkt werden. Voraussetzung hierfür ist, daß die verwendeten Antikörper eine Fc-Region besitzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Arzneimittel, die Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten enthalten, wovon eine das MHCII-Antigen eines Patienten erkennt. Eine Spezifität erkennt dabei das MHCII-Antigen des Patienten, wohingegen eine weitere Spezifität z. B. ein Antigen erkennen kann, das ebenfalls auf der zu eliminierenden Zelle vorhanden ist, ein Antigen, das auf einer anderen Zelle, beispielsweise einer Effektorzelle lokalisiert ist, oder ein beliebiges anderes Antigen. Hierbei sind solche zu nennen, die die Effektorfunktion des Antikörpers verstärken, d. h. dessen Fähigkeit, die Antigen-tragende Zelle zu eliminieren. Dazu zählen z. B. toxische Substanzen, wie weiter unten erläutert wird.

Die Verwendung von Antikörpern mit mehr als einer Spezifität in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln bietet sich beispielsweise an, um die Selektivität zu erhöhen, mit der die Antikörper eine zu eliminierende Zielzelle, beispielsweise eine Tumorzelle, im Vergleich zu anderen Zellen erkennen. Wie bereits oben erläutert, wird das MHCII-Antigen zum Teil auch von nicht-malignen Zellen, z. B. Leberzellen, auf der Zelloberfläche präsentiert, wenn auch in wesentlich geringerer Dichte. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper für MHCII-exprimierende Tumorzellen zu erhöhen, können beispielsweise Antikörper eingesetzt werden, die zwei verschiedene auf der zu eliminierenden Zelle lokalisierte Antigene erkennen. Es handelt sich dabei um sogenannte bispezifische Antikörper. Bevorzugt werden dabei Antikörper verwendet, die neben dem MHCII-Antigen des zu behandelnden Patienten ein tumorassoziiertes Antigen erkennen.

Der Begriff tumorassoziiertes Antigen bedeutet dabei, daß ein derartiges Antigen im Vergleich zu nicht-malignen Zellen bevorzugt von Zellen des zu behandelnden Tumors exprimiert wird, und/oder auf nicht-malignen Zellen in geringerer Dichte vorkommt.

Bei dem zweiten Antigen kann es sich ferner um ein Antigen handeln, das spezifisch von dem Gewebe, von dem der Tumor abstammt, exprimiert wird.

Gegenüber monospezifischen Antikörpern, die nur das MHCII-Antigen oder nur ein tumorassoziiertes oder gewebespezifisches Antigen erkennen, weisen derartige bispezifische Antikörper den Vorteil auf, daß sie an Zellen, die beide Antigene präsentieren, mit wesent-

lich höherer Affinität und Spezifität binden, als an Zellen, die lediglich eines der beiden Antigene präsentieren (Parham; Human Immunol. 12 (1985), 213; Wong und Colvin, J. Immunol. 139 (1987), 1369; siehe auch Fig. 1).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Arzneimittel handelt es sich bei dem Antigen, das neben MHCII von einem MHCII-spezifischen Antikörper mit zwei oder mehreren Spezifitäten erkannt wird, um ein Antigen, das auf Leukämiezellen, Zellen der Hämatopoese oder entarteten Zellen des Endothels oder Epithels exprimiert wird.

Vorzugsweise handelt es sich dabei um das Antigen CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11, CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD44v3, CD44v6, CD45R, CD56, B220, einen Ig-Idiotyp, einen IL-2-Rezeptor oder einen IL-6-Rezeptor. Für die spezifische Erkennung von B-Zell-Lymphomen sind beispielsweise Antikörper geeignet, die neben dem MHCII-Antigen die Antigene CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD44v3, CD44v6, CD10, CD5, B220 oder einen Ig-Idiotyp erkennen. Antigene wie CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7 und CD8 können spezifisch T-Zell-Lymphomen zugeordnet werden. Die Antigene CD11, CD13, CD14 und CD33 ermöglichen die spezifische Erkennung von myeloischen Leukämien, das Antigen CD41 hingegen von thrombozytären Leukämien. Dagegen bieten sich für die spezifische Erkennung von Zellen eines Hodgkin-Lymphoms, eines anaplastischen "large cell" Lymphoms oder einer adulten T-Zell-Leukämie Arzneimittel an, die Antikörper enthalten, die neben dem MHCII-Antigen des zu behandelnden Patienten einen IL-2-Rezeptor erkennen. Für die spezifische Erkennung von Myelomen bieten sich ferner Arzneimittel an, bei denen die Antikörper neben dem MHCII-Antigen des zu behandelnden Patienten einen IL-6-Rezeptor erkennen.

Die Eliminierung von Zellen, insbesondere von Tumorzellen, die durch die beschriebenen, in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper erkannt werden, kann in vivo durch Komplement-Reaktionen oder durch antikörpervermittelte Zytotoxizität mittels Fc-Rezeptor-tragender Zellen erfolgen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die erfindungsgemäßen Arzneimittel Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, wobei eine Spezifität das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennt und eine weitere Spezifität ein Antigen, das spezifisch auf einer Effektorzelle lokalisiert ist. Daneben kann ein derartiger Antikörper weitere Spezifitäten besitzen, wie unten noch weiter ausgeführt wird.

Unter dem Begriff Effektorzelle werden dabei Zellen verstanden, die aus der Hämatopoese hervorgehen und zytolytische, Apoptose-vermittelnde oder Phagozytose-Eigenschaften besitzen. Insbesondere umfaßt dieser Begriff T-Zellen, Granulozyten, Monocyten, Makrophagen, NK ("natural killer")-Zellen, Mastzellen und Langerhans-Zellen.

Bei dem auf der Effektorzelle lokalisierten Antigen, das von dem Antikörper erkannt wird, handelt es sich vorzugsweise um das Antigen CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD13, CD16, CD28, CD32, CD33, CD45R, CD56, CD64 oder einen Interleukin-2-Rezeptor.

Mit Hilfe derartiger Antikörper ist es möglich, Effektorzellen zu aktivieren und/oder an Zielzellen heranzuführen, was somit zu deren Zerstörung führt.

Antikörper, die beispielsweise neben dem MHCII-

Antigen eines zu behandelnden Patienten das Antigen CD3 erkennen, sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren und an die Zielzellen. (MHCII-exprimierende Zellen) heranzuführen. Dies führt zur Zerstörung der Zielzellen über T-Zell-vermittelte Mechanismen. Antikörper, die das Antigen CD28 erkennen, das ebenfalls auf T-Zellen exprimiert wird und der Kostimulation während der Stimulation mittels CD3 dient, ermöglichen ebenfalls die Aktivierung von Effektorzellen. Ähnlich sind Antikörper, die die Antigene CD16, CD32 oder CD64 erkennen, in der Lage, Fc-Rezeptor-positive Zellen, wie z. B. NK-Zellen, Granulocyten oder Makrophagen, zu aktivieren und an die MHCII-tragenden Zielzellen, insbesondere Tumorzellen, heranzuführen. Dies führt im folgenden ebenfalls zur Zerstörung der Zielzellen.

Arzneimittel, die Antikörper enthalten, die neben dem Patienten-MHCII-Antigen das Antigen CD3, CD16, CD28, CD32 oder CD64 erkennen, eignen sich neben der oben beschriebenen Eliminierung von Zielzellen in vivo ebenso zur in-vitro-Anwendung zur Eliminierung von Tumorzellen, insbesondere bei allogener Knochenmarktransplantation.

Antikörper, die die Antigenkombinationen MHCII \times CD1, MHCII \times CD2, MHCII \times CD4, MHCII \times CD5, MHCII \times CD8, MHCII \times CD28, MHCII \times CD45R oder MHCII \times Interleukin-2-Rezeptor erkennen, sind ferner dafür geeignet, aktivierte T-Zellen zu erkennen und zu eliminieren, was im Zusammenhang mit der Unterdrückung einer Host-versus-Graft-Reaktion, einer Autoimmunreaktion oder der Auslösung einer generalen Immunsuppression von Bedeutung sein kann.

Für denselben Zweck eignen sich Antikörper, die die Antigenkombinationen MHCII \times CD11b, MHCII \times CD56 erkennen, die auf "Natural Killer"-Zellen exprimiert werden, sowie Antikörper, die die Antigenkombinationen MHCII \times CD13 oder MHCII \times CD33 erkennen, die auf Monocyten und Makrophagen exprimiert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die in den beschriebenen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper eine Spezifität, d. h. eine oder mehrere Bindungsstellen, auf, die in der Lage ist, spezifisch eine toxische Substanz zu binden, z. B. Saporin oder Ricin. Dies ermöglicht es, die Zielzellen selektiv und direkt durch das Toxin zu eliminieren.

Darüber hinaus sieht eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Arzneimittel vor, daß die in ihnen enthaltenen Antikörper mit Substanzen gekoppelt sind, die die Effektorfunktion der Antikörper, die zur Eliminierung der Zielzelle führen, verbessern.

Die zellzerstörende Wirkung von Antikörpern beruht normalerweise auf den Effektorfunktionen der Fc-Region der Antikörper. So können z. B. Fc-Rezeptor-tragende Zellen an eine mit Antikörpern besetzte Zelle binden und diese zerstören. Diese auch als ADCC ("antibody dependent cell mediated cytotoxicity") bezeichnete Reaktion reicht jedoch häufig nicht aus, um effektiv alle Zielzellen zu zerstören.

Bei den Substanzen, die an die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper gekoppelt werden können, handelt es sich vorzugsweise um Enzyme, toxische Substanzen, Biotin, Radionuclide oder Superantigene.

Im Zusammenhang mit der Kopplung des Antikörpers mit einem Enzym ist beispielsweise die von Rodrigues et al. (Cancer Res. 55 (1995), 63) beschriebene sogenannte "antibody dependent enzyme mediated prodrug therapy" (ADEPT) zu nennen. Bei diesem Verfahren

wird die Vorstufe einer toxischen Substanz unmittelbar am vorgesehenen Wirkort, beispielsweise an der Tumorzelle, durch ein Enzym, das an den Antikörper gekoppelt ist, aktiviert. Dieses Prinzip ist umso effizienter und freier von Nebenwirkungen, je spezifischer der verwendete Antikörper die Zielzelle erkennt. Ein bevorzugt in dieser Methode verwendetes Enzym ist beispielsweise die β -Lactamase.

Beispiele für toxische Substanzen, die direkt an die verwendeten Antikörper gekoppelt werden können, sind Ricin, Saporin oder Pertussis-Toxin.

Durch die Kopplung des in dem Arzneimittel enthaltenen Antikörpers mit Biotin ist es ferner möglich, an Avidin konjugierte Substanzen an Zielzellen anzureichern.

Vorteilhaft ist dies beispielsweise bei der Applikation von Radionuclid-Avidin-Konjugaten. In diesem Fall werden die Konjugate erst verabreicht, wenn der mit Biotin gekoppelte Antikörper bereits an die Zielzelle gebunden hat. Die Konjugate werden aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Avidin sehr spezifisch an den Zielzellen angereichert. Ungebundene Radionuclid-Avidin-Konjugate werden dagegen aufgrund ihrer geringen Größe schnell aus dem Organismus entfernt.

Der Vorteil der Verwendung derartiger Antikörper in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln ist eine relativ geringe unspezifische radioaktive Belastung des Patienten bei ihrer Anwendung. Dieser Vorteil kann noch verstärkt werden, wenn Antikörper mit mehreren Spezifitäten, die eine hohe Zielzellspezifität aufweisen, verwendet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper gekoppelt mit einem Superantigen. Superantigene sind extrem potente Aktivatoren von T-Zellen. Ein Beispiel ist das SEA ("staphylococcal enterotoxin A"). T-Zellen werden durch Superantigene zur Proliferation sowie zur Freisetzung von Cytokinen und der Cytolyse benachbarter Zellen angeregt. Ausgelöst wird diese unkontrollierte, systemische T-Zellaktivierung durch Bindung der Superantigene an konservierte Bereiche von MHCII-Molekülen bzw. die V β -Kette des T-Zellrezeptors. Dohlstien et al. (Proc Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 8945) beschreibt, daß die unspezifische Bindung an MHCII durch eine spezifischere Antigenbindungsstelle eines Antikörpers ersetzt werden kann. Dadurch gelingt es, die T-Zellaktivierung wesentlich kontrollierter ablaufen zu lassen. Durch geeignete Kombination der Antigenspezifitäten eines Antikörpers kann auch hier die Cytolyse-Wirkung der aktivierten T-Zellen auf eine bestimmte Zielzelle begrenzt werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Arzneimittel sieht vor, daß die in dem Arzneimittel enthaltenen Antikörper als membranständige Antikörper in sogenannten Immunoliposomen vorliegen.

Unter Immunoliposomen versteht man Liposomen, die auf ihrer Oberfläche gebunden Antikörper aufweisen (siehe z. B. Phillips et al., J. Immunol. 152 (1994), 3168). Der Aufbau eines sterisch stabilisierten Immunoliposoms ist schematisch in Fig. 2 gezeigt. In derartigen Liposomen können cytotoxische Agentien eingeschlossen werden. Durch membranständige Antikörper, die spezifisch eine Zielzelle erkennen, wie oben beschrieben, können diese Liposomen gezielt zu den Zielzellen dirigiert werden. Die durch den membranständigen Antikörper vermittelte hohe Spezifität ist aufgrund der hohen Toxizität der in den Liposomen eingeschlossenen

Agentien sehr wichtig.

Bei den in den erfindungsgemäßen oben beschriebenen Arzneimitteln enthaltenen Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um monoclonale, polyclonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte Antikörper, sowie um Fragmente derartiger Antikörper, insbesondere Fv, Fab, scFv oder F(ab)₂-Fragmente.

Sind die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper für eine in-vivo-Therapie vorgesehen, werden bevorzugt Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet, oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z. B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörpertypen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig.

Die Herstellung monoclonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z. B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z. B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) beschrieben sind.

Die Herstellung polyclonaler Antikörper ist ebenfalls beschrieben, beispielsweise in Harlow und Lane (s. o.).

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe z. B. Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z. B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und Rekombinante identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z. B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv) angekoppelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

—S—S(G₄S)_nD—I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin). Fig. 6 zeigt schematisch den Aufbau eines derartigen trispezifischen Antikörpers, der das Antigen CD3 mittels des angekoppelten scFv-Fragmentes erkennt.

Analog dazu können trispezifische F(ab)₂-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hin-

ge"-Region) in das codierende Gen, z. B. mittels homologer Rekombination entfernt werden (siehe Fig. 7).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (siehe Fig. 8).

Bei der Herstellung von Antikörpern, die mit einem Superantigen gekoppelt sind, wird beispielsweise eine der schweren Immunglobulinketten eines Antikörpers oder Antikörperfragmentes um eine T-Zell-aktivierende Superantigensequenz verlängert. Dabei kann diese Sequenz z. B. über einen

—S—S(G₄S)_nD—I-Linker

mit einer der schweren Ig-Ketten verbunden sein. Das Anfügen der Linker- und Superantigensequenzen an die schwere Ig-Kette kann beispielsweise mittels homologer Rekombination auf DNA-Ebene in einer Hybridomazelllinie stattfinden (Lang und Mocikat, Mol. Gen. Genet. 242 (1994), 528). Eine derartige Konstruktion eines bispezifischen Antikörpers mit einer Superantigensequenz ist beispielhaft in Fig. 3 gezeigt.

Ferner ist es möglich, F(ab)₂-Fragmente mit einem Superantigen zu koppeln. Dies ist in Fig. 4 beispielhaft für ein bispezifisches F(ab)₂-Fragment gezeigt. In diesem Fall werden die CH2, CH3-Regionen einer schweren Immunglobulinkette durch eine Superantigensequenz ersetzt, während die CH2- und CH3-Regionen der anderen schweren Immunglobulinkette durch den Einbau eines Stopcodons mittels homologer Rekombination entfernt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, sogenannte "single chain variable fragments" (scFv) mit einem Superantigen zu koppeln. Dies ist beispielhaft für ein derartiges bispezifisches Fragment in Fig. 5 gezeigt. Hierbei werden beispielsweise lediglich die V-Regionen mit verschiedener Spezifität aneinandergesetzt bei vollständiger Entfernung der konstanten Antikörperregionen und anschließend wird an eine der V-Regionen wie oben beschrieben eine Superantigensequenz gekoppelt.

Neben den beschriebenen Antikörpern können die erfindungsgemäßen Arzneimittel gängige, dem Fachmann geläufige pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe enthalten.

Ein Therapieschema zur Eliminierung residueller Tumorzellen nach einer MHCII-inkompatiblen Knochenmarkstransplantation mit Hilfe der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann beispielsweise darin bestehen, daß bereits frühzeitig nach der Knochenmarkstransplantation Antikörper verabreicht werden, die spezifisch das MHCII-Antigen des Empfängers erkennen und die eine Eliminierung der Tumorzellen durch ADCC oder Komplement-Mechanismen erlauben, oder Antikörper, die neben dem Empfänger-MHCII-Antigen ein Antigen auf einer Fc-Rezeptor-positiven Effektorzelle (z. B. NK-Zellen, Granulozyten oder Makrophagen) erkennen. Da nach einer Knochenmarkstransplantation Fc-Rezeptor-positive Zellen schneller aus dem Spenderknochenmark heranwachsen als T-Zellen, kann mit einer derartigen Behandlung bereits wenige Tage nach der Transplantation begonnen werden. Wenn genügend T-Zellen vom Spendertyp nachgebildet wurden (dies ist der Fall, wenn im peripheren Blut der T-Zellanteil auf über 5% steigt) können anschließend Antikörper verabreicht werden, die spezifisch das Empfänger MHCII-Antigen und daneben das Antigen CD3 erkennen. Hierdurch werden T-Zellen aktiviert und an die MHCII-exprimierenden

Tumorzellen herangeführt, was zu deren Eliminierung führt.

Durch eine derartige Kombination von unterschiedlichen Therapieformen können bereits in einem früheren Stadium, wenn erst wenige über lebende Tumorzellen in dem Patienten existieren, diese effektiv und sehr selektiv mit relativ geringen Mengen an Antikörpern und ohne wesentliche Nebenwirkungen angegriffen werden. Da nach Knochenmarktransplantationen immer noch ein sehr hoher Prozentsatz der Patienten (ca. 40%) am Leukämieerzidiv verstirbt, könnte daher eine derartig milde, nebenwirkungsarme Therapieform bei allen Patienten vorbeugend vorgenommen werden, ohne ein Rezidiv abzuwarten und dadurch die Behandlungsaussichten wesentlich zu verschlechtern.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich neben der beschriebenen in vivo-Immuntherapie nach MHCII-inkompatibler Knochenmarktransplantation auch zur Immuntherapie nach autologer Knochenmarktransplantation und auch generell zur in vivo- und in vitro-Tumordepletion. Durch Kombination einer anti-MHCII- mit beispielsweise einer anti-CD10-Spezifität kann die Selektivität der in den Arzneimitteln enthaltenen Antikörper für Tumorzellen derart gesteigert werden, daß eine Schädigung anderer MHCII-tragender Zellen oder Gewebe fast vollkommen ausgeschlossen ist.

Einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung stellen die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper dar. Ausgenommen sind dabei monospezifische Antikörper, die ein MHCII-Antigen erkennen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, die mindestens eine Antigenbindungsstelle aufweisen, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die bevorzugten Ausführungsformen derartiger Antikörper, wie sie oben als Bestandteile bzw. Wirkkomponenten der erfindungsgemäßen Arzneimittel beschrieben sind.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung derartiger Antikörper, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen, und ihrer bevorzugten Ausführungsformen, sowie die Verwendung von monospezifischen MHCII-erkennenden Antikörpern, zur Herstellung von Arzneimitteln zur in vivo- oder in vitro-Immuntherapie, insbesondere von Tumoren, vorzugsweise von Leukämien und von Tumoren aus entarteten Zellen des Epithels oder Endothels. Von Interesse ist insbesondere die Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen, anaplastischen "large cell" Lymphomen, adulten T-Zell-Leukämien oder Myelomen.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper, sowie von monospezifischen Antikörpern, die das MHCII-Antigen eines Patienten erkennen, zur Unterdrückung einer Host-versus-Graft-Reaktion, zur Unterdrückung einer Autoimmunreaktion oder zur Auslösung einer Immunsuppression.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die monospezifische Antikörper, die spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennen, oder die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Antikörper enthalten.

Fig. 1 zeigt die prinzipielle Wirkungsweise bispezifischer Antikörper.

scher Antikörper

Fig. 2 zeigt schematisch den Aufbau von sogenannten Immunoliposomen

PC = Phosphatidylcholin

PEG = Polyethylenglykol

PE = Phosphatidylethanolamin

Fig. 3 zeigt schematisch einen mit einer Superantigensequenz gekoppelten bispezifischen Antikörper

Sag = Superantigensequenz

bsAK = bispezifischer Antikörper

Fig. 4 zeigt schematisch ein bispezifisches F(ab)₂-Superantigenkonstrukt

Sag = Superantigensequenz

bsF(ab)₂ = bispezifisches F(ab)₂-Fragment

Fig. 5 zeigt schematisch ein bispezifisches "single chain variable fragment"-Superantigen-Konstrukt.

Sag = Superantigensequenz

bs-scFv = bispezifisches "single chain variable fragment"

Fig. 6 zeigt schematisch einen trispezifischen Antikörper, bei dem ein "single chain variable fragment", das CD3 erkennt, über einen Linker an eine der schweren Ketten eines bispezifischen Antikörpers gekoppelt wurde.

triAK = trispezifischer Antikörper

Fig. 7 zeigt schematisch ein trispezifisches F(ab)₂-Konstrukt, bei dem eine schwere Kette eines bispezifischen Antikörpers durch ein scFv-Fragment ersetzt wurde, das CD3 erkennt, und bei dem die andere schwere Kette entfernt wurde.

Fig. 8 zeigt schematisch ein trispezifisches scFv-Konstrukt

Fig. 9 zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, in der den in Beispiel 1 beschriebenen Balb/c-Mäusen BCL1-Zellen injiziert werden.

HB3 = Antikörper gegen den MHCII-Haplotyp I-A^d

BiC = bispezifischer Antikörper mit den Spezifitäten anti-I-A^d und anti-CD3.

Wie aus dieser Figur ersichtlich ist, konnte eine signifikante Steigerung der Überlebensrate bei Mäusen beobachtet werden, denen MHCII-spezifische Antikörper injiziert wurden.

Das Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel 1

Um die Nutzbarkeit des MHCII-Antigens als operationelles, tumorspezifisches Antigen zu prüfen, das die spezifische Eliminierung von MHCII-exprimierenden Tumorzellen erlaubt, wurden Balb/c (I-A^d+/C57BL/6 (I-A^b+) chimären Mäusen (MHCII- und MHCII-inkompatibel) 2 × 10⁴ BCL1-Zellen (B-Zell-Lymphom, I-A^d+) injiziert.

Vier Tage später wurde den behandelten Mäusen 10 µg anti-I-A^d(MHCII)-Antikörper injiziert. Bei derart behandelten Mäusen konnte eine signifikante Verlängerung (log rank, p = 0,04) der Überlebenszeit beobachtet werden, im Vergleich zu Kontrollmäusen, denen 2 × 10⁴ BCL1-Tumorzellen, jedoch kein Antikörper injiziert wurde (siehe Fig. 9).

Patentansprüche

1. Arzneimittel, enthaltend Antikörper mit mindestens einer Spezifität für das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei es sich bei

dem Antikörper um einen monospezifischen Antikörper handelt.

3. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Antikörper um einen Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten handelt.

4. Arzneimittel nach Anspruch 3, wobei der Antikörper mindestens eine Spezifität aufweist, die ein Antigen erkennt, das auf Leukämiezellen, Zellen der Hämatopoese oder entarteten Zellen des Epithels oder Endothels exprimiert wird.

5. Arzneimittel nach Anspruch 4, wobei es sich bei dem Antigen um eines der folgenden Antigene handelt: CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11, CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD44v3, CD44v6, CD45R, CD56, B220, Ig-Idiotyp, einen IL-2-Rezeptor, einen IL-6-Rezeptor oder ein tumorassoziertes Antigen.

6. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei der Antikörper mindestens eine Spezifität aufweist, die ein Antigen auf einer Effektorzelle erkennt.

7. Arzneimittel nach Anspruch 6, wobei es sich bei den Effektorzellen um T-Zellen, Granulozyten, Monocyten, Makrophagen, NK(natural killer)-Zellen, Mastzellen oder Langerhans-Zellen handelt.

8. Arzneimittel nach Anspruch 6 oder 7, wobei es sich bei dem Antigen auf der Effektorzelle um CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD13, CD16, CD28, CD32, CD33, CD45R, CD56, CD64 oder einen IL-2-Rezeptor handelt.

9. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Antikörper eine Bindungsstelle aufweist, die in der Lage ist, spezifisch eine toxische Substanz zu binden.

10. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment gekoppelt ist mit einem Enzym, einer toxischen Substanz, einem Radionuclid, Biotin oder einem Superantigen.

11. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Antikörper als membranständiger Antikörper in einem Immunoliposom vorliegt.

12. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen, polyclonalen, chimären, rekombinanten, (halb-) synthetischen oder chemisch modifizierten Antikörper handelt oder um ein Fragment eines solchen Antikörpers.

13. Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, der mindestens eine Antigenbindungsstelle aufweist, die spezifisch das MHCII-Antigen eines Patienten erkennt.

14. Antikörper nach Anspruch 13, der mindestens eine weitere Spezifität aufweist, die ein Antigen auf einer Effektorzelle erkennt.

15. Antikörper nach Anspruch 14, wobei es sich bei dem Antigen der Effektorzelle um CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD13, CD16, CD28, CD32, CD33, CD4SR, CD56, CD64 oder einen IL-2-Rezeptor handelt.

16. Antikörper nach Anspruch 14 oder 15, wobei es sich bei den Effektorzellen um T-Zellen, Granulozyten, Monocyten, Makrophagen, NK(natural killer)-Zellen, Mast-Zellen oder Langerhans-Zellen handelt.

17. Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei der Antikörper mindestens eine weitere

Spezifität aufweist, die ein Antigen erkennt, das auf Leukämiezellen, Zellen der Hämatopoese oder entarteten Zellen des Epithels oder Endothels exprimiert wird.

18. Antikörper nach Anspruch 17, wobei die weitere Spezifität eines der folgenden Antigene erkennt: CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11, CD11b, CD13, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD33, CD40, CD41, CD44v3, CD44v6, CD45R, CD56, B220, Ig-Idiotyp, einen IL-2-Rezeptor, einen IL-6-Rezeptor oder ein tumorassoziertes Antigen.

19. Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen, rekombinanten, (halb-) synthetischen oder chemisch modifizierten Antikörper oder um ein Fragment eines solchen Antikörpers handelt.

20. Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei der Antikörper gekoppelt ist mit einem Enzym, einer toxischen Substanz, einem Radionuclid, Biotin oder einem Superantigen.

21. Verwendung eines monospezifischen Antikörpers, der spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennt, oder eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 13 bis 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immuntherapie.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich bei der Immuntherapie um eine Therapie zur Behandlung von Tumoren handelt.

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei es sich bei dem Tumor um eine Leukämie handelt.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei es sich bei der Leukämie um ein B-Zell-Lymphom, ein Hodgkin-Lymphom, ein anaplastisches "large cell" Lymphom, eine adulte T-Zell-Leukämie oder ein Myelom handelt.

25. Verwendung nach Anspruch 22, wobei es sich bei dem Tumor um entartete Zellen des Epithels oder Endothels handelt.

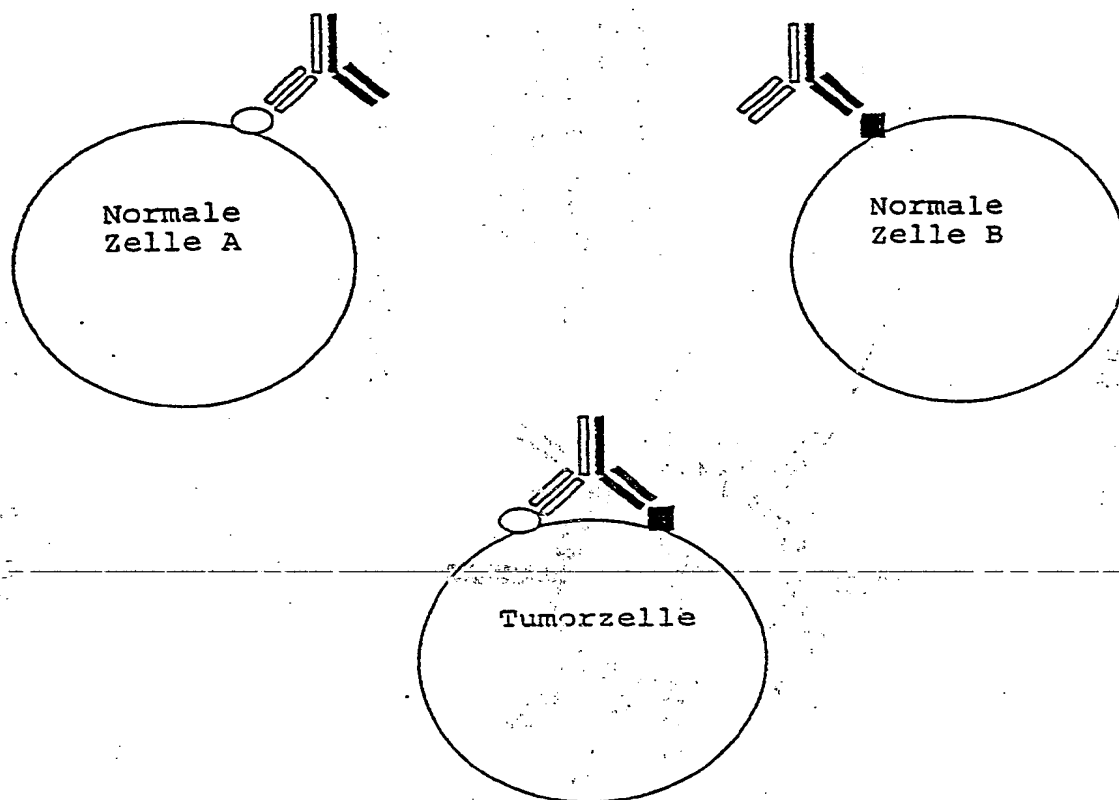
26. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich bei der Immuntherapie um eine Therapie zur Unterdrückung einer "Host-versus-Graft"-Reaktion handelt.

27. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich bei der Immuntherapie um eine Therapie zur Unterdrückung einer Autoimmunreaktion handelt.

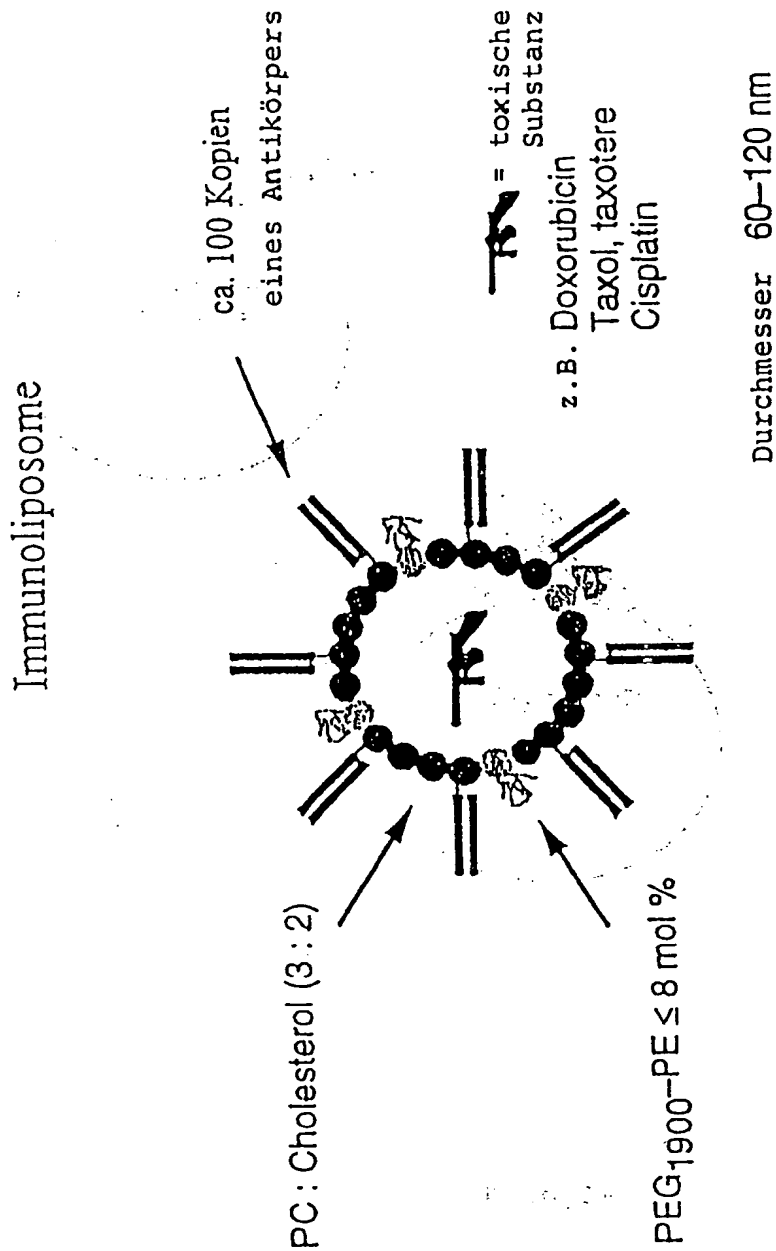
28. Verwendung nach Anspruch 21, wobei es sich bei der Immuntherapie um eine Therapie zur Auflösung einer Immunsuppression handelt.

29. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend einen monospezifischen Antikörper, der spezifisch das MHCII-Antigen eines zu behandelnden Patienten erkennt, oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 20.

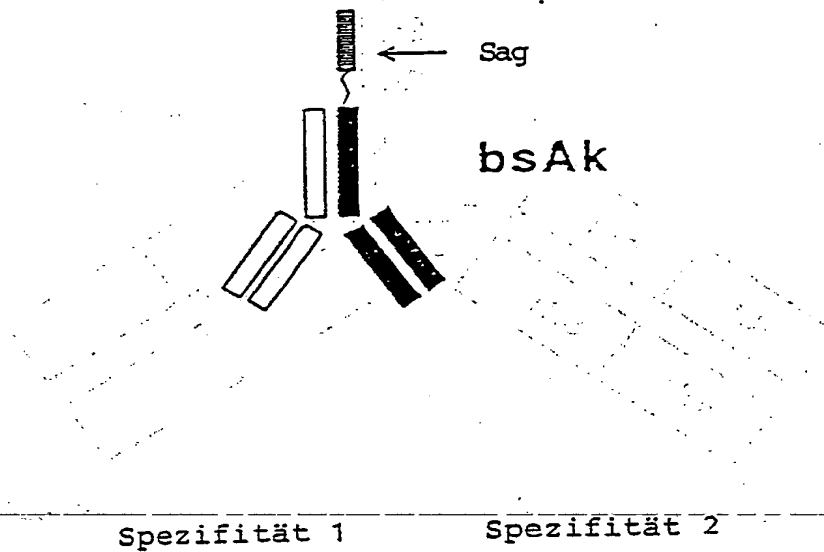
Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen



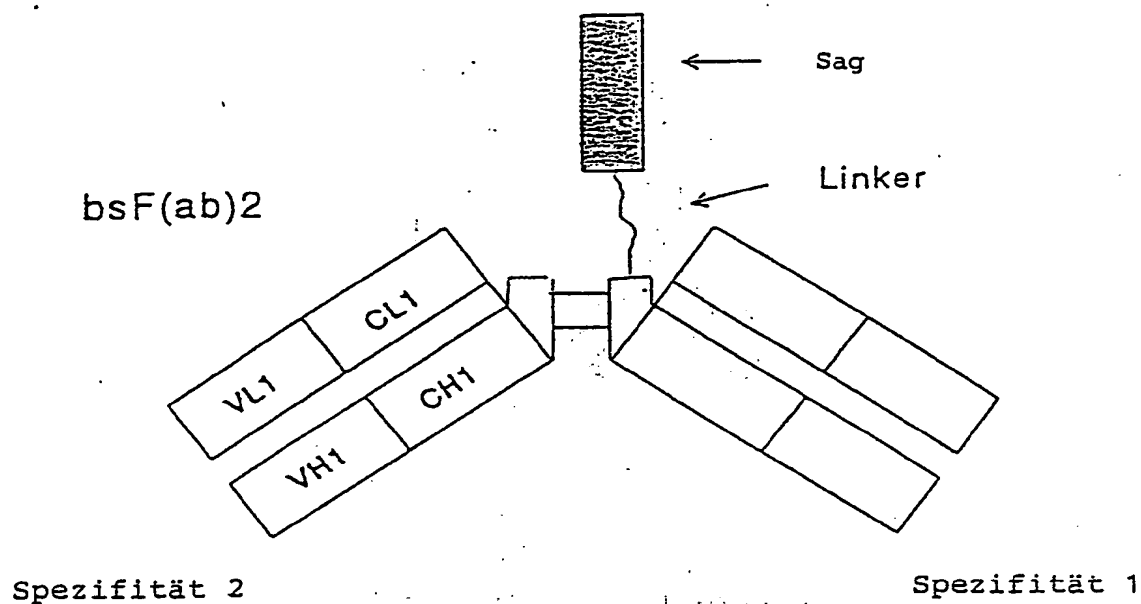
Figur 1



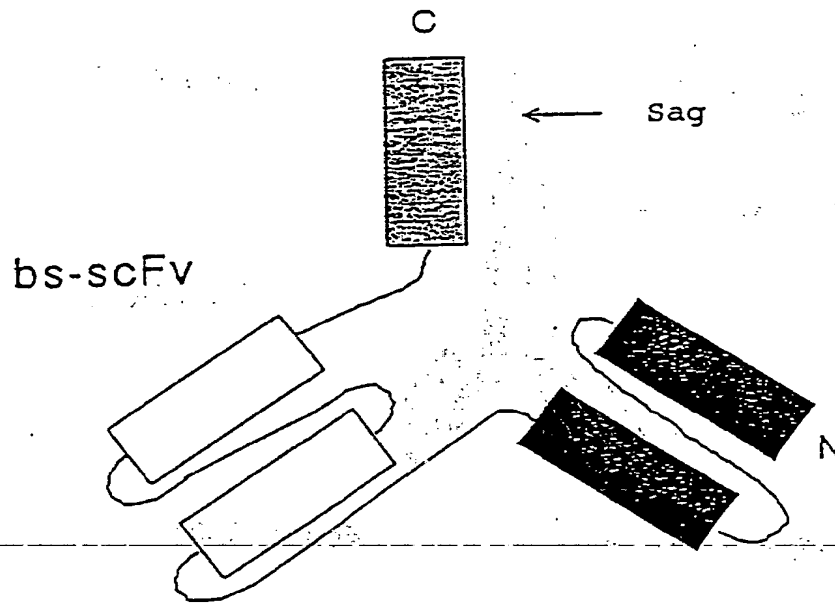
Figur 2



Figur 3



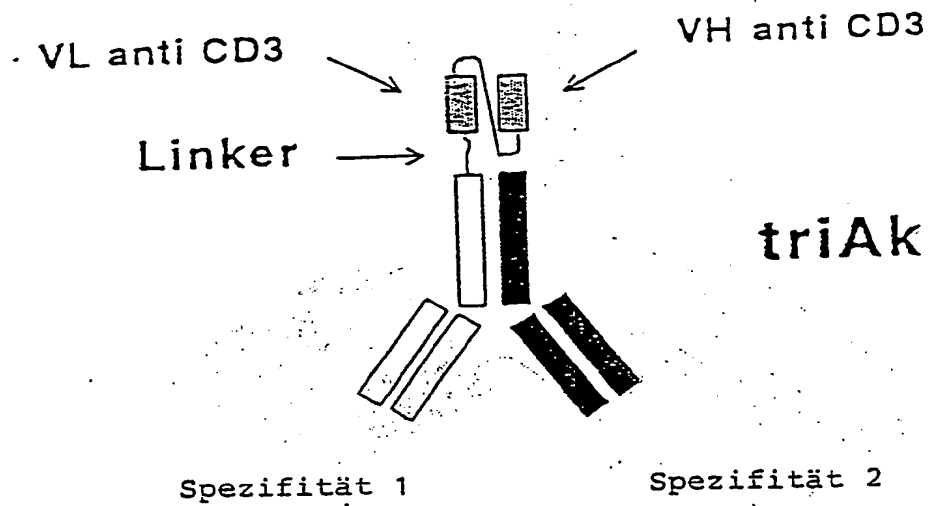
Figur 4



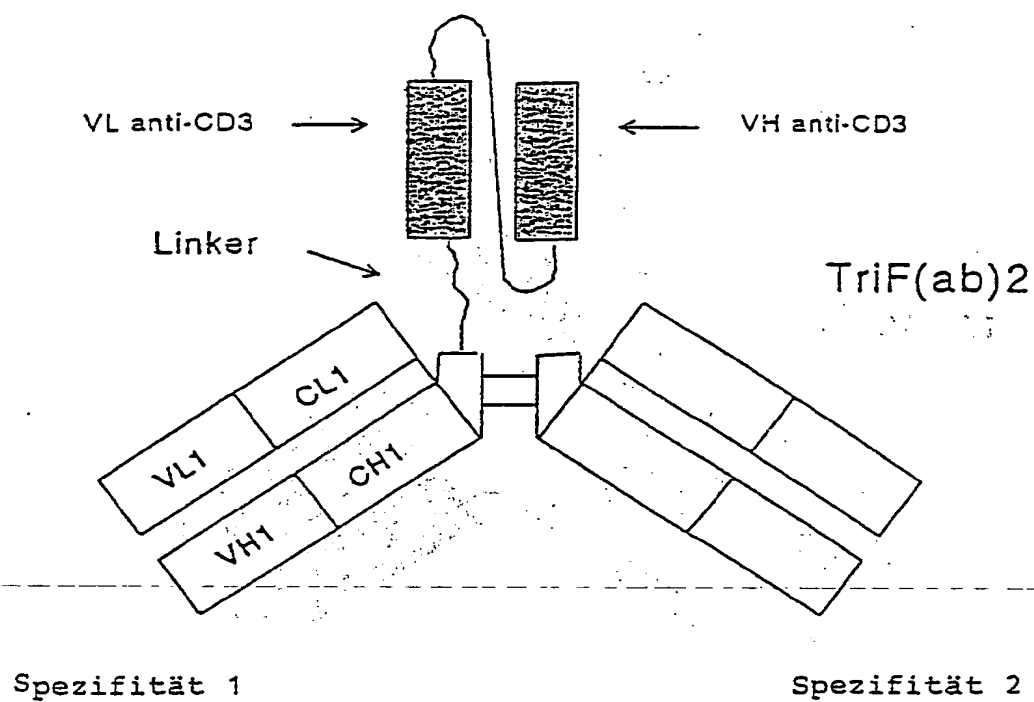
2. Spezifität

1. Spezifität

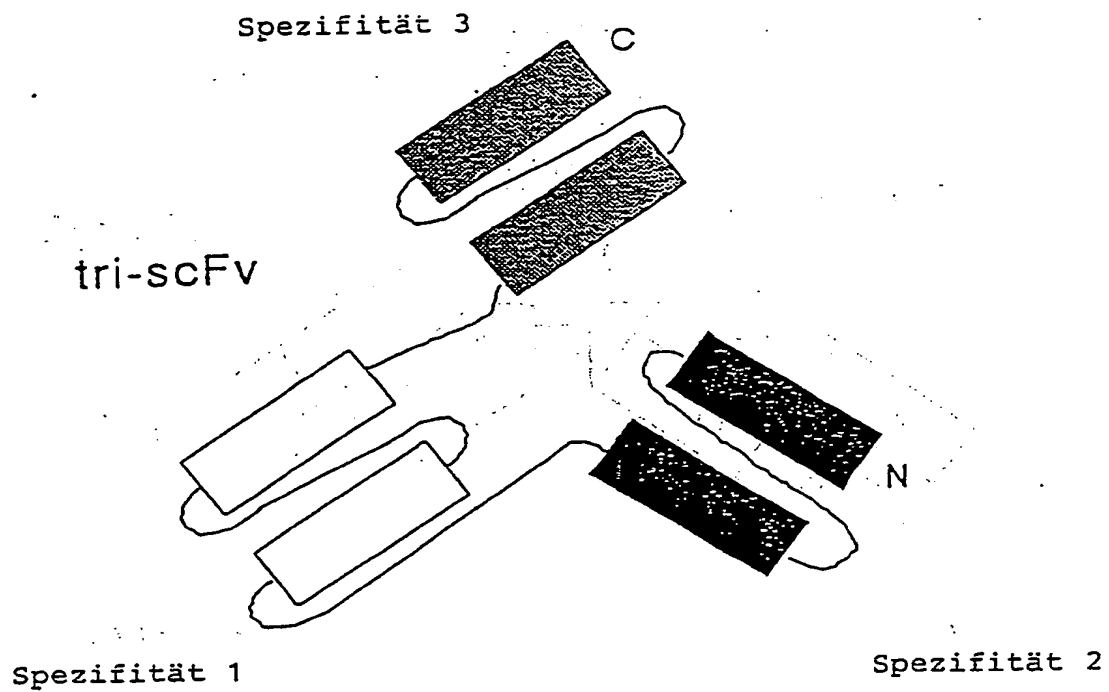
Figur 5



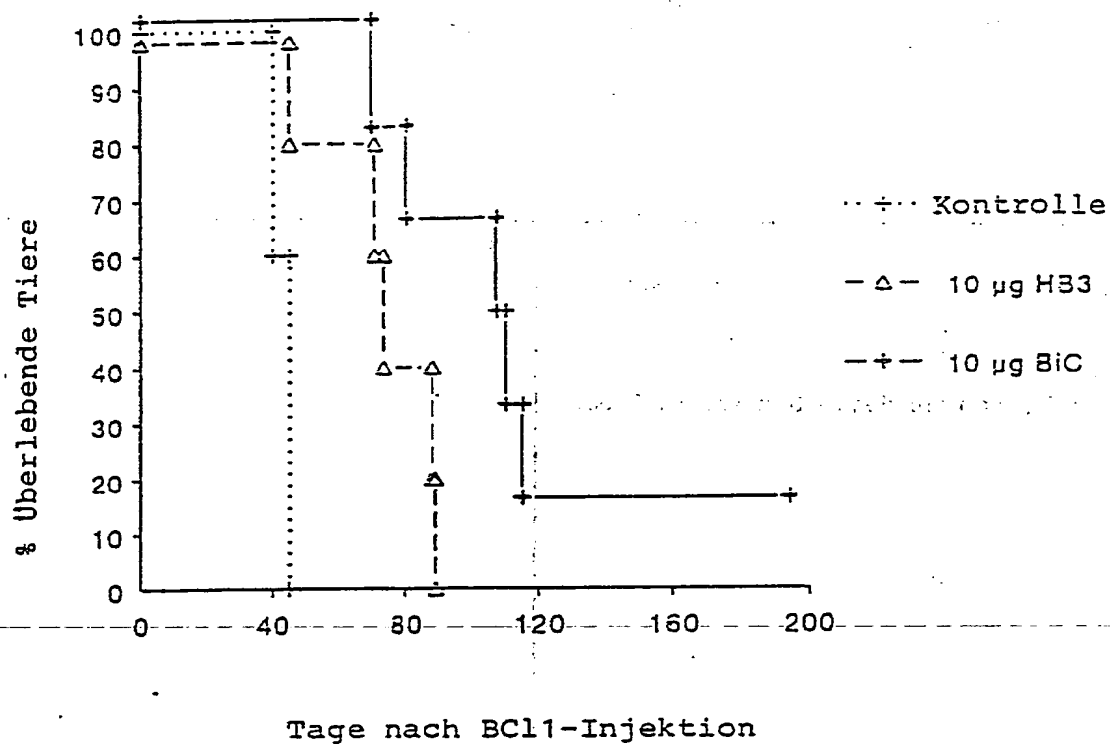
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)